Untersuchungen zum Nachweis zirkulierender und zellgebundener heterologer Leukozytenantikörper mit Hilfe fluoreszenzimmunologischer Technik

---

von

Dr. med. Dietrich Kahre

aus Berlin

1964

1964 № 71

Aus der Medizinischen Klinik mit Poliklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. N. H E N N I N G

UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS ZIRKULIERENDER UND ZELLGEBUNDENER HETEROLOGER LEUKOZYTENANTIKÖRPER MIT HILFE FLUORESZENZIMMUNOLOGISCHER TECHNIK.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
E R L A N G E N

Vorgelegt von:
Dr. med. Dietrich Kahre
aus Berlin

Tag der mündlichen Prüfung:
31. 7. 1964

Referent: Professor Dr. Norbert H E N N I N G

Dekan: Professor Dr. Gerhard T H E I S S I N G

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Das Vorkommen von Leukozytenantikörpern bei Immunoleukopenie oder -agranulozytose (im einzelnen bei SCHEIFFARTH und FRENGER 1961 (31)) hat zugleich das Interesse an ihrer Natur und Bedeutung geweckt. Man muß annehmen, daß die beim Menschen nachgewiesenen Leukozytenantikörper, die sich z. B. posttransfusionell entwickeln, durch homologes, oder in entsprechenden Fällen durch autologes Antigen induziert sind.

Der Nachweis der Leukozytenantikörper wird üblicherweise mit verschiedenen Methoden im Krankenserum geführt (5, 21). Da nachgewiesen werden konnte, daß den zirkulierenden Antikörpern für die Entstehung der Immunoagranulozytose nur untergeordnete Bedeutung zukommt, wird angenommen, daß die im Gewebe insbesondere im Knochenmark vorkommenden zellständigen Antikörper zytotoxische Wirkung entfalten, d. h. das eigentliche pathogenetische Prinzip darstellen. Sessile oder zellfixierte Antikörper konnten bisher allenfalls durch Übertragungsversuche wahrscheinlich gemacht werden (21, 22). Eine direkte Nachweismethode stand nicht zur Verfügung. Seit einigen Jahren hat sich nun auch die Möglichkeit ergeben gewebsgebundene Faktoren mit Hilfe eines Antigens oder Antikörperglobulins nachzuweisen, das nach der Technik von COONS und KAPLAN (6, 7, 8) sowie anderen (27, 28, 37) fluoresziert wird (2, 11, 12, 18, 19, 24, 29, 30, 39, 40). Hierbei wird der indirekte Nachweis, z. B. mit fluoresziertem Antihumanglobulin (sogenannte Sandwich - Technik), der direkten Methode vorgezogen. In eigenen Untersuchungen über die nachfolgend berichtet wird, sollte unter Anwendung die-

ser Technik versucht werden, neben der Existenz zirkulierender Antikörper den Nachweis gewebsfixierter Antikörper an Zellen verschiedener Organe zu erbringen.

Material und Methodik

I. Gewinnung menschlicher Leukozyten

a. mit Titriplex - Macrodex

Die Reingewinnung von Leukozyten bereitet häufig Schwierigkeiten. Eine von WILMANNS (38) angegebene Methode modifizierten wir in folgender Weise: Magnesium - Titriplex III - Pulver (1 Messerspitze) wurde in 2 ml Macrodex in silikonisierten Röhrchen gelöst. Dann wurden 8 ml Nativblut dieser Lösung zugesetzt, das Röhrchen kurz geschüttelt und bei Zimmertemperatur 30 Minuten stehen gelassen. In dieser Zeit sedimentierten die Erythrozyten, die überstehende gelbliche, leukozytenreiche Suspension wurde abpipettiert, 20 Minuten in den Kühlschrank gegeben und anschließend bei 500 U zentrifugiert. Das weitgehend reine Leukozytensediment wurde mit 0,83 %iger Ammoniumchloridlösung aufgeschlämmt und wiederum 5 Minuten bei 500 U zentrifugiert, wodurch die restlichen Erythrozyten hämolysiert wurden. Anschließend wurde mit Ringerlösung (3 mal) gewaschen und das Sediment in 2 ml Ringerlösung suspendiert. Es enthielt ca. 50 Mill. Leukozyten.

b. mit Zitratblut

In einer weiteren Methode zur Gewinnung der Leukozyten wurde

Natriumzitrat (3,8 %ig) im Verhältnis 1:10 mit Venenblut gemischt und 15 Minuten bei 2000 U zentrifugiert. Sodann wurde die auf den Erythrozyten sitzende Leukozytenschicht abpipettiert, in physiologische NaCl- oder Ringerlösung gegeben und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis das Sediment annähernd erythrozytenfrei war. Bei der Leukozytengewinnung aus Zitratblut waren bis zu 10 hochtourige Zentrifugengänge notwendig, wodurch die Zellen mechanisch stark beansprucht wurden. Hierbei entstanden Zellaggregate, die eine Resuspension des Sedimentes erschwerten. Bei der Titriplex - Macrodex - Methode war dies in jedem Fall leicht möglich. Mikroskopische Kontrollen zeigten hier reine Leukozytensuspensionen intakter Zellen, weshalb wir dieser Methode den Vorzug gaben.

II. Sensibilisierung von Kaninchen mit menschlichen Leukozyten

Vier Kaninchen (Gewicht ca. 2,5 kg) wurden sensibilisiert. Tier I und II erhielten in 2tägigem Abstand eine Leukozytensuspension intraperitoneal appliziert, insgesamt 6 Injektionen. Spätere Boosterinjektionen und die Sensibilisierung der Tiere III und IV erfolgte im gleichen Rhythmus, jedoch intravenös. Eine Anaphylaxie war bei keinem der Tiere zu beobachten.

III. Gewinnung von: Gammaglobulin, Serum, Leukozyten, Knochenmarkszellen und Peritonealexsudatzellen sowie Milz-, Leber-, und Lymphknotentupfpräparaten von sensibilisierten Tieren.

Antileukozytenserum

Kaninchenserum wurde wenige Tage nach der letzten Immunisierung gewonnen, mit einer menschlichen Leukozytensuspension zusammengebracht und auf diese Weise der Serumantikörpergehalt durch Agglutination grob ermittelt. Außerdem wurde die Gammaglobulin - Fraktion des Serums mit Ammonsulfat ausgefällt (auf methodische Einzelheiten kann hier verzichtet werden). (Papierelektrophoretisch stellten sich bei der Kontrolle dieser Fraktion im wesentlichen Gammaglobuline dar.) Mit dem Gammaglobulin konnte in gleicher Weise Leukozytenagglutination erzielt werden.

Kaninchenleukozyten

Die Kaninchenleukozyten wurden mit der angegebenen Titriplex - Macrodex - Methode gewonnen. Die Präparation aus Zitratblut war auch hier nicht befriedigend.

Knochenmarkszellen

Die Knochenmarkpunktion am Beckenkamm wurde in Narkose durchgeführt und die gewonnenen Markbröckel sofort ausgestrichen. Bei allen Tieren war ein zellreicher Ausstrich zu gewinnen.

Zellen des Peritonealexsudats

Zur Gewinnung dieser Zellen verabfolgten wir je einem sensibilisierten und einem Kontrolltier Paraffinum liq. intraperitoneal in einer Dosierung von 10 ml/ 100g Körpergewicht (Methode nach SCHMID und HAGGE (34)). Nach 48 Stunden wurden die Tiere getötet, die Bauchhöhle mit Ringerlösung gespült, die Lösung mit Paraffin abgezogen und 5 Minuten bei 500 U zentrifugiert. Das Sediment wurde einmal mit Ringerlösung gewaschen und eine konzentrierte Zellsuspension in der gleichen Lösung hergestellt.

Milz-, Leber- und Lymphknotenausstriche

Nach Gewinnung von Serum, Leukozyten und Knochenmarkszellen wurden die Tiere mit je 5 x 10^7 Zellen nachsensibilisiert und 4 Tage später - nach erneuter Blutabnahme - getötet. Die Leber wurde entnommen und sofort mit physiologischer Kochsalzlösung durchspült, bis die Spülflüssigkeit klar war. Das Organ wurde sodann in Stücke geschnitten und diese auf Objektträgern ausgestrichen. Andere Stückchen wurden gefriergeschnitten. Die Milz konnte nicht durchspült werden; sie wurde sonst in gleicher Weise behandelt; das gleiche gilt für die Mesenteriallymphknoten. Knochenmark wurde aus den Beckenknochen gewonnen.

IV. Fluorochromierung des Antileukozyten - Gammaglobulin

Das ausgefällte Kaninchen - Gammaglobulin wurde folgendermaßen fluorochromiert: Nach Bestimmung des Eiweiß - Gehaltes wurde pro 1 mg Eiweiß 0,025 mg Fluoreszenz - Farbstoff in folgender Weise zugesetzt:

In einer Petrischale wurden 2,5 ml einer 0,9 %igen NaCl - Lösung mit 0,75 ml Carbonat - Puffer und 0,5 ml Aceton einige Minuten gekühlt, dann hierin die vorgesehene Farbstoffmenge gelöst und anschließend 2,5 ml Gammaglobulin zugegeben. Nach 12-stündigem Rühren bei + 4° C wurde das Gemisch gegen 5,0 l 0,9 %iger NaCl - Lösung, gepuffert mit 17,9 g sekundärem Natriumphosphat, solange dialysiert, bis die Dialysierflüssigkeit, die mindestens in 8-stündigen Abständen erneuert wurde, farblos war. Der Rest des nicht gammaglobulingebundenen Farbstoffes wurde mit gefriergetrocknetem Leberpulver absorbiert. Nach Waschen des Leberpulvers wurde dieses mit dem Dialysat aufgeschlämmt, 30 Minuten bei 37° C inkubiert, bei 4000 U zentrifugiert und das Dialysat sorgfältig abpipettiert. Mit dem so fluoreszierten Gammaglobulin trat ebenfalls eine Agglutination mit menschlichen Leukozyten, dem spezifischen Antigen, ein.

V. Anfertigung der Zellausstriche und ihre Fluorochromierung nach der sog. Sandwich - Technik

Ausstriche von Leukozyten, Exsudat-, Knochenmarks-, Milz-, Leber- und Lymphknotenzellen wurden luftgetrocknet und nach ÖYSTESE (23) in 95 %igem Alkohol fixiert (30 Minuten). Danach wurden die Ausstriche sofort für 30 Minuten in wasserfreies Aceton gegeben und wiederum luftgetrocknet. Nach Überschichtung mit 2 Tropfen fluorochromiertem Antikaninchenglobulin +) wurden die Ausstriche 60 Minuten in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur inkubiert, mit physiologischer Kochsalz - Lösung gewaschen (4 mal 10 Minuten) und getrocknet.

+) Travenol International München

VI. Herstellung von Kontrollpräparaten

Neben den 4 Versuchstieren wurde nicht sensibilisierten Tieren Blut, die gleichen Organe und ein in oben angegebener Weise provoziertes Peritonealexsudat entnommen und gleichartig bearbeitet. Von jeder Ausstrichserie wurde je ein Präparat nach Pappenheim oder mit HE gefärbt, um einen Überblick über Art, Zustand und Verteilung der Zellen zu bekommen. Ein weiteres Präparat wurde unfixiert und unbearbeitet im Fluoreszenz - Mikroskop angesehen, um die Intensität der Eigenfluoreszenz zu erkennen, weiterhin je ein fixiertes, nicht weiter bearbeitetes Präparat. Zuletzt wurde neben den mit Antikaninchenglobulin behandelten Präparaten Ausstriche mit fluoresziertem Antihumanglobulin +) und nur mit reiner Fluoreszenzfarbstofflösung inkubiert.

VII. Fluoreszenzmikroskopie

Als Mikroskop benutzten wir eine große Fluoreszenz - Einrichtung (Carl Zeiss), die sich aus

1. Fluoreszenzleuchte mit Anschlußgerät (Quecksilber Höchstdruckbrenner Typ HBO 200 Osram),
2. Beleuchtungseinrichtung mit Erregerfiltern,
3. Mikroskop mit Sperrfiltereinrichtung und
4. Grundplatte mit Laufstange und Kamera

zusammensetzt.

VIII. Bewertung der Fluoreszenz in den einzelnen Präparaten

Nach Durchmusterung sämtlicher Präparate schienen folgende Punkte für die Beurteilung der Fluoreszenz bedeutungsvoll zu sein:

+) Travenol International München

1. Plasma- oder Kernfluoreszenz der Zelle
2. Fluoreszenz der Zellmembran
3. Fluoreszierende Zelltypen und ihre Struktur
4. Granuläre Fluoreszenz
5. Intensität und Schärfe der Fluoreszenz
6. Vergleich der fluoreszierten mit den nach Pappenheim gefärbten Ausstrichen
7. Fluoreszenz des Zwischengewebes oder Untergrundes

Ergebnisse

I. Agglutination menschlicher Leukozyten durch Antileukozytenserum und fluorochromiertes Antileukozyten - Gammaglobulin zum Nachweis des zirkulierenden Leukozytenantikörpers

Zur Prüfung des Sensibilisierungserfolges mit heterologen Leukozyten wurde das Antiserum der Kaninchen mit menschlichen Leukozyten zusammengebracht (Tab. 1). Dabei kam es regelmäßig zur Leukozytenagglutination, die häufig bereits makroskopisch festgestellt werden konnte (Abb. 1). Die Zellen beider Gewinnungsarten zeigten keinen Unterschied in ihrer Agglutinationsfähigkeit. Desgleichen trat eine Agglutination der Leukozyten bei Verwendung des nicht fluorochromierten wie auch des fluoreszierten Gammaglobulins dieser Versuchstiere ein. Gleichartige Versuche bei nicht sensibilisierten Kontrolltieren verliefen negativ. Auch die Inkubation mensch-

lichen Gammaglobulins und Antihumanglobulins vom Kaninchen (Coombsserum) mit Leukozyten von sensibilisierten wie auch von nicht sensibilisierten Tieren hatte keine Agglutination dieser Zellen zur Folge. Das fluoreszierte Antileukozyten - Gammaglobulin vom sensibilisierten Tier agglutinierte regelmäßig menschliche Leukozyten; die Zellagglutinate ließen eine sehr intensive und brillante Fluoreszenz ihres Plasmas erkennen (Abb. 2). Der Kern war zumeist nur von einer feinen Fluoreszenzschicht überzogen. Zellgranula waren nicht dargestellt.

II. Nachweis des fixierten Leukozytenantikörpers an verschiedenen Zelltypen unter Verwendung von fluorochromiertem Antikaninchenglobulin

Die Ausstriche von Leukozyten der Versuchstiere zeigten nach Behandlung mit fluoreszierendem Antikaninchenglobulin eine brillante Plasmafluoreszenz, vornehmlich an kleineren, rundkernigen Zellen mit exzentrisch gelegenem Kern. Das Plasma größerer derartiger Zellen fluoreszierte dagegen schwächer (Abb. 3). Die mit Antihumanglobulin inkubierten Kontrollausstriche wiesen zumeist eine diffuse Fluoreszenz des Zytoplasmas auf; lediglich vereinzelt kleine Zellen fluoreszierten deutlicher, ohne daß sie allerdings gut abgrenzbar und differenzierbar waren (Abb. 4). Wenn Ausstriche mit nicht fluoreszierendem Antikaninchenglobulin vorbehandelt und danach fluoreszierendes Antikaninchenglobulin zugesetzt wurde, konnte dennoch bei einzelnen rundkernigen Zellen mit exzentrisch

gelegenem Kern eine deutliche Plasmafluoreszenz festgestellt werden (Abb. 5). Auch ein Versuch, bei dem der fixierte Leukozytenausstrich zunächst mit nicht fluoreszierendem Antihumanglobulin (Coombsserum) und danach mit fluoreszierendem Antihumanglobulin inkubiert wurde, bot überraschenderweise eine brillante, gut abgrenzbare Plasmafluoreszenz einiger kleiner mononucleärer Zellen. Bei dem größeren Teil der Zellen war jedoch keine Fluoreszenz nachzuweisen (Abb. 6). Die Leukozytenpräparate nicht sensibilisierter Tiere wiesen nach Behandlung mit fluoreszierendem Anti-Kaninchenglobulin zumeist eine der Eigenfluoreszenz entsprechende Leuchtkraft auf; vereinzelt speicherten kompakte kleine Zellen Farbstoff, ohne daß Zellbestandteile abzugrenzen waren (Abb. 7). Mit fluoreszierendem Anti-humanglobulin bearbeitete Präparate dieser Serie zeigten zum überwiegenden Teil eine deutliche, nicht differenzierte Fluoreszenz. Ganz vereinzelt boten kleinere Zellen eine brillante Plasmafluoreszenz (Abb. 8).

Die Knochenmarkausstriche sensibilisierter Tiere zeigten mit einer Ausnahme eine brillante Plasmafluoreszenz. Die Kerne fluoreszierten nicht; sie schienen allenfalls mit einem hauchdünnen Fluoreszenzschleier überzogen. Die Abgrenzung Kern - Plasma sowie Plasma - Umgebung war scharf. Es fluoreszierten vorwiegend große, mehr runde, segmentierte oder stabkernige, teilweise auch polynucleäre Zellen; vereinzelt intrazelluläre und extrazelluläre Granulafluoreszenz (Abb. 9). Nicht fluoreszierende Zellen konnten nicht abgegrenzt werden. Im allgemeinen entsprach die Zellzahl und Verteilung dem nach Kappen-

heim gefärbten Präparat. Das Zwischengewebe bot teilweise eine intensivere Fluoreszenz, sonst entsprach die Grundfluoreszenz der Eigenfluoreszenz nach Fixation. Zwei Ausstriche boten Besonderheiten. In einem Fall kamen - entsprechend dem gefärbten Präparat - keine Zellen der myeloischen Reihe zur Darstellung. Man kann diesen Befund, da das Mark nach mehrmaliger Nachimmunisierung in kurzen Abständen entnommen war, im Sinne eines "erschöpften" Markes deuten. In einem anderen Ausstrich zeigte ein großer Teil der Erythrozyten einen scharfen, intensiven, gut abgegrenzten Fluoreszenzsaum. Als Ursache dafür könnte eine Antikörperbildung auch gegen Erythrozyten bei Verwendung eines nicht reinen Antigens bei der Sensibilisierung angesehen werden. Bei den Markausstrichen der nicht sensibilisierten Kontrolltiere kamen keine fluoreszierenden Zellen zur Darstellung (Abb. 10). Das Zwischengewebe zeigte teilweise eine kräftige Fluoreszenz. Im Rahmen der Kontrollversuche waren Ausstriche von sensibilisierten und nicht sensibilisierten Tieren mit nicht fluorochromiertem Antikaninchenglobulin vorbehandelt worden. Nach der anschließenden Fluorochromierung mit Antikaninchenglobulin zeigten sich in geringerer Zahl fluoreszierende Zellen der Myelopoese. Daneben waren zahlreiche nicht fluoreszierende Zellen zu erkennen. Ein Vergleich der Struktur der fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Zellen ergab keine sicheren Unterschiede. Das gleichartig behandelte Präparat des Kontrolltieres blieb auch hier negativ.

Die vielfach polynucleären Exsudatzellen sensibilisierter Tiere ließen eine brillante, scharf begrenzte Plasmafluoreszenz erkennen. Die Kerne erschienen ausgespart. Daneben vorhandene rundkernige Elemente fluoreszierten schwächer, etwa in Stärke der Eigenfluoreszenz. Ihre Kerne waren mit einem Fluoreszenzschleier überzogen (Abb. 11, 12, 13). Im gefärbten Präparat fanden sich zahlreich Granula enthaltende Zellen; sie fehlten dagegen im entsprechenden fluorochromierten Ausstrich. Sonst entsprachen sich die Präparate weitgehend. Der Exsudatausstrich des Kontrolltieres bot eine diffuse, nahezu homogene Fluoreszenz sämtlicher Zellen, die der Eigenfluoreszenz entsprach (Abb. 14). Bei der Fluoreszierung mit Antihumanglobulin boten die Präparate des sensibilisierten Tieres eine deutliche, aber nur in einzelnen Fällen eine stärkere, nicht scharf abgegrenzte Fluoreszenz (Abb. 15). Das Bild der Ausstriche des Kontrolltieres glich dem Ausstrich nach Behandlung mit Antihumanglobulin.

Zellen der Milz waren im Quetschpräparat sensibilisierter Tiere nach Bearbeitung mit fluoreszierendem Antikaninchenglobulin zumeist von einem zarten fluoreszierenden Ring umschlossen (Abb. 16). Außerdem zeigte sich im Zellinnern - der aufgelockerten Struktur entsprechend - eine fein verästelte, intensive Fluoreszenz. Die mit fluoreszierendem Antihumanglobulin inkubierten Praaparate boten dagegen eine diffuse Fluoreszenz zwischen den Zellen, bei der die Zellen als nicht fluoreszierende Elemente ausgespart blieben. In

den Kontrollpräparaten, denen zunächst nicht fluoreszierendes Antikaninchenglobulin, dann fluoreszierendes Antikaninchenglobulin zugesetzt wurde, fluoreszierte der Untergrund schwach, die Milzzellen überhaupt nicht. Ein sicherer Unterschied in der Fluoreszenz zwischen den Quetschpräparaten und den Gefrierschnitten der Milz ergab sich nicht.

Von der Leber wurden in gleicher Weise Quetschpräparate und Gefrierschnitte hergestellt. Nach Inkubation mit fluoreszierendem Antikaninchenglobulin konnte in keinem Präparat der sensibilisierten Tiere eine eindeutige Fluoreszenz des Leberplasmas oder der Leberzellkerne nachgewiesen werden. Auch die Kontrollpräparate wiesen keine Fluoreszenz der Kerne auf. Daneben fiel eine große Zahl rundkerniger Zellen - knapp in Größe der Leukozyten - auf, die häufig 2-3 Kerne hatten. Diese Zellen zeigen eine deutliche Plasmafluoreszenz. Auch in den Kontrolpräparaten der nicht sensibilisierten Tiere fluoreszierten diese Zellen, ohne aber eine Brillanz zu zeigen oder gut abgrenzbar zu sein. Bei den einzelnen Präparaten der sensibilisierten wie auch der nicht sensibilisierten Tiere fand sich eine schollige Plasmafluoreszenz der Leberzellen, die in ihrer Intensität etwas über der Eigenfluoreszenz lag. Waren die Präparate mit Antikaninchenglobulin vorbehandelt und dem fluoreszierendem Antikörper ausgesetzt, so imponierten die Leberzellen als Schatten auf homogen fluoreszierendem Untergrund (Abb. 17).

Die Mesenteriallymphknotenausstriche vom sensibilisierten Tier ließen nach Bearbeitung mit fluoreszierendem Antikaninchenglobulin eine brillante, scharfe Randfluoreszenz kleiner, runder Zellen erkennen. Diese entsprachen in ihrer Verteilung den lymphoiden Zellen im nach Pappenheim gefärbten Präparat. Außerdem fanden sich meist größere, locker strukturierte Zellen ohne wesentliche Fluoreszenz (Abb. 18). Im Präparat des nicht sensibilisierten Tieres war keine Zellfluoreszenz nachzuweisen (Abb. 19). Auch bei Verwendung von Antihumanglobulin zur Fluorochromierung der Ausstriche sensibilisierter Tiere war keine Zellfluoreszenz festzustellen.

Beurteilung weiterer Kontrollpräparate

Die unbearbeiteten Zellausstriche zeigen meist eine deutliche diffuse Eigenfluoreszenz der bindegewebigen Anteile, zwischen denen die Zellen ausgespart blieben, d. h. ein Negativbild abgaben (Abb. 20). Nach Fixierung des Präparates war festzustellen, daß die Eigenfluoreszenz abgenommen hatte. War das Präparat nur mit Fluoreszenzfarbstofflösung behandelt, so entsprach seine Fluoreszenz der Eigenfluoreszenz des unfixierten Ausstriches bei zumeist stärkerer Fluoreszenz des Bindegewebes. Die Zellen schienen mit einem Schleier überzogen, ließen aber keinerlei Brillanz erkennen. Insgesamt war die Fluoreszenz diffus und als unspezifisch zu erkennen (Abb. 2

Diskussion

Die Pathogenese gewisser Formen der Agranulozytose und Leukopenie war bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts Gegenstand serologischer Untersuchungen (1, 26, 32, 33). Erst in jüngerer Zeit gelang es, die Entstehung dieser Formen, die als Immunoleukopenie oder Immunoagranulozytose bezeichnet werden, einer gewissen Klärung zuzuführen (5, 21, 22). Man konnte feststellen, daß Plasmafaktoren des Gammaglobulinbereiches in solchen Fällen eine leukozytenagglutinierende Wirkung entfalten, weshalb sie als Antikörper betrachtet wurden. Nach Herkunft des Antigens, sind heterologe von homologen und autologen Antikörpern zu unterscheiden. Sofern sie eine genügend hohe Konzentration erreichen und ein Proteinextrakt des Leukozyten - Antigens zu gewinnen ist, kann die Leukozyten - Antikörper - Reaktion nicht nur als Agglutination, sondern auch als Präzipitation in Erscheinung treten. In den eigenen Untersuchungen konnte eine Leukozytenagglutination unter Sensibilisierung mit heterologem Leukozyten - Antigen sowohl mit fluoresziertem, als auch mit nicht fluoresziertem Gammaglobulin der sensibilisierten Tiere erzielt werden. Dabei zeigten, wie in den Ergebnissen angeführt ist, die Agglutinate bei Verwendung des fluoreszierten Kaninchengammaglobulins eine starke Fluoreszenz (s. Abb. 1 u. 2). Diese war auch nach Leukozytenagglutination mit Kaninchengammaglobulin und anschließender Überschichtung mit Antikaninchengammaglobulin (Sandwich - Technik) festzustellen. Die eigenen Ergebnisse sprechen demnach ebenso wie die anderer

Autoren (4, 10, 11, 12) dafür, daß die in der Serumgammaglobulin - Fraktion der sensibilisierten Tiere vorhandenen Antikörper an die heterologen Leukozyten gebunden werden und deren Agglutination verursachen. Ihre Leukozytenspezifität ist somit mit verschiedener Technik bewiesen. Offenbar wird der Antikörper durch die Fluorochromierung nicht verändert. Die Art der Zellfluoreszenz läßt darauf schließen, daß das Leukozytenantigen in der Zellmembran oder dem Zellplasma lokalisiert ist, wie dies bereits früher von STEINBERG und MARTIN (36) angenommen wurde.

Den im Blute zirkulierenden Antikörpern wird in der Pathogenese der Immunoagranulozytose oder Leukopenie von maßgeblichen Autoren (im einzelnen bei SCHEIFFARTH und FRENGER (31)) nur untergeordnete Bedeutung beigemessen, wie dies vor allem auch ihre meist niedrige Serumkonzentration beweist. Man neigt deshalb heute zu der Annahme, daß zellständige Antileukozytenfaktoren eine größere Rolle in der Entstehung dieser Erkrankung spielen, bei der auch die Leukozytenvorstufen des Knochenmarks eine Schädigung erfahren (3, 25). Der Nachweis zellständiger Faktoren gestaltete sich schwierig; er war nur indirekt zu führen. MELLORS und Mitarbeitern (19, 20) sowie BRAUNSTEINER (2) und auch anderen (9) gelang der Nachweis eines zellständigen Rheumafaktors. Die hierbei gewonnenen Erfahrungen ließen eine solche Möglichkeit auch für den Bereich der Immunohämatologie diskutabel erscheinen. MC KENNA und PISCIOTTA (18) konnten mit Hilfe fluorochromierten Anti-humanglobulins die Fixation eines Antikörpers an Megakaryozyten bei chronischer idiopathischer Thrombopenie wahrschein-

lich machen. Auf gleiche Weise wiesen MARMONT und Mitarbeiter (15) mit Hilfe von Antibeta - und -gamma - Makroglobulin die Existenz von Antikörpern an bestimmten Knochenmarkzellen bei einer Makroglobulinämie WALDENSTRÖM nach.

Uberblickt man die eigenen Ergebnisse, so ist festzustellen, daß Antikörper an Knochenmark, Lymphknoten und Peritonealexsudat, also hauptsächlich dort vorkommen, wo sich vermehrt lymphoide Zellelemente finden. An den Knochenmarkssausstrichen (s. Abb. 3), die mit fluoresziertem Antikaninchenglobulin behandelt waren, war im Gegensatz zu den Kontrollen (Zellen nicht sensibilisierter Tiere (s. Abb. 4)) eine kräftige Fluoreszenz vorwiegend an relativ großen, runden Zellen nachzuweisen. Im Neutralisationsversuch, d.h. nach vorheriger Behandlung der Ausstriche mit nicht fluoresziertem Antikaninchenglobulin und nachfolgender Uberschichtung mit fluoresziertem Antikaninchenglobulin, war eine eindeutige Minderung der Zahl fluoreszierender Zellen und der Intensität der Fluoreszenz festzustellen. Die weiteren Befunde der Zellausstriche von Lymphknoten und des peritonealen Reizexsudats sensibilisierter Tiere (s. Abb. 11 u. 18) hatten ähnlich gute Ergebnisse wie die Knochenmarkausstriche. Dagegen waren diese an peripheren Leukozyten und Leberzellausstrichen nicht eindeutig, da auch die Kontrolltiere deutlichere Färbung an den entsprechenden Zellelementen aufwiesen, so daß eine spezifische Fluoreszenz kaum abgegrenzt werden konnte. Auf diese Tatsache wurde bereits aufmerksam gemacht (39). Unter Verwendung von fluoresziertem Antihumanglobulin war eine spezifische Bindung eher bei den Leukozyten- und Leberzellausstri-

chen, dagegen in wesentlich geringerem Ausmaß an Zellen der weiteren Organe festzustellen.

Wenn man die Ergebnisse insgesamt betrachtet, so lassen sie auf Grund der Bindung fluorochromierten spezifischen Antiserums den Schluß zu, daß ein Antileukozytenfaktor auch zellulär vorhanden oder fixiert ist, wie dies beispielsweise bei antikörperbedingter hämolytischer Anämie der Fall ist, wo mit Hilfe des Antihumanglobulins sessile Erythrozytenantikorper nachgewiesen werden.

Unspezifische Ergebnisse sind aus vielfachen Gründen möglich, so in der Hauptsache durch die Affinität leicht saurer Markierungsmittel zu leicht basischem Zytoplasma, ungenügende Dialyse der Konjugate, unspezifische Reaktion der markierten Proteine, Bindung von Proteinen an Zellen trotz reichlichen waschens der Zellsuspension (im einzelnen bei MAYERSBACH (16), KOPP (13), POETSCHKE (27), LUIS (14)). Zur Vermeidung von Fehlermöglichkeiten wurden - nach den Empfehlungen von MAYERSBACH (17) - Spezifitätsproben in folgender Weise angestellt:

1. Verwendung von Zellmaterial oder Serum nicht sensibilisierter Tiere.
2. Neutralisationsversuch (Vorbehandlung der Zellen mit nicht fluoreszierendem spezifischen Protein und nachfolgende Inkubation mit fluoresziertem Protein).
3. Verwendung eines heterologen, nicht spezifisch abgestimmten fluoreszierten Proteins. Dabei sollte ein negatives Ergebnis eintreten, d. h. die Zellen keine Fluoreszenz zeigen.

Die angeführten Ergebnisse lassen deshalb umso eher den Schluß zu, daß die Leukozytenantikörper zellfixiert sind. Simultane Färbungen der Ausstriche nach Pappenheim zeigen, daß sie vorwiegend an lymphoiden Zellen vorhanden sind. Sofern eine brillante Fluoreszenz als Ausdruck des Antikörpernachweises vereinzelt auch im Kontrollpräparat auftrat, ist am ehesten anzunehmen, daß entweder eine unspezifische Affinität des Konjugates eingetreten ist (27, 28), oder aber Gammaglobuline anderer Genese an die Zellen fixiert sind. Auch diese werden mit dem verwendeten Antiglobulin (in den eigenen Fällen Antikaninchenglobulin) nachgewiesen. Die Art der Zellfluoreszenz in den eigenen wie auch den Untersuchungen anderer Autoren (2, 13, 19, 20, 27, 28) läßt vorsichtige Schlußfolgerungen auf die Spezifität des Vorganges zu. Findet sich granuläre Fluoreszenz außerhalb des Zellbereiches, so ist diese nicht verwertbar (13). In den eigenen Untersuchungen war eine granuläre Fluoreszenz vereinzelt an sensibilisierten wie auch an nicht sensibilisierten Zellen festzustellen, im allgemeinen war eine mehr oder minder intensive Plasma- oder Randfluoreszenz der Zellen vorhanden. In Übereinstimmung mit den genannten Autoren läßt sie unter Beachtung möglicher Fehlerquellen somit weitgehende Schlußfolgerungen hinsichtlich der Spezifität des Prozesses zu (35).

Zusammenfassung

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden heterologe Leukozytenantikörper erzeugt, die durch Agglutination der spezifischen Leukozyten nachgewiesen wurden. Eine Leukozytenagglutination wurde auch mit dem Gammaglobulin der sensibilisierten Tiere erreicht. Nach Fluorochromierung des Antikörpergammaglobulins mit Fluoreszein - Isothiocyanat konnte dieses mit Hilfe fluoreszenzoptischer Technik nachgewiesen werden, womit ein weiterer Spezifitätsbeweis erbracht wurde.

Zum Nachweis zellfixierter Leukozytenantikörper wurden periphere Leukozyten, Knochenmarkszellen, Zellsedimente aus Ascites sowie Lymphknoten-, Milz- und Lebertupfpräparate mit fluorochromiertem Antikaninchenglobulin imkubiert. Von diesen Zellausstrichen zeigten vorwiegend Zellen des Knochenmarks, der Lymphknoten und aus Ascites eine brillante Fluoreszenz; dabei handelte es sich um lymphoide Zellelemente. Die übrigen Organe erbrachten kein eindeutiges Ergebnis. Hier war vielfach unspezifische Fluoreszenz festzustellen. Die beschriebenen Ergebnisse werden durch den Ausfall der Kontrollen unterstrichen. Durch Absättigungsversuche mit nicht fluoresziertem Antikaninchenglobulin konnte zwar eine eindeutige Fluoreszenzminderung, jedoch kein Fehlen der Fluoreszenz bei späterer Behandlung mit dem fluorochromierten Antikaninchenglobulin beobachtet werden. Insgesamt machen auch diese Untersuchungsergebnisse wahrscheinlich, daß der heterologe Leuko-

zytenantikörper nicht nur zirkulierend vorhanden, sondern auch an Zellen verschiedener Organe festzustellen ist.

T a b e l l e

Agglutinationsversuche mit menschlichen und tierischen

Versuchstier

Mensch	Kaninchen sensibilisiert	Agglutination
Leukozyten[+)]	+ Serum	+
Leukozyten	+ Gamma-Globulin	+
Leukozyten	+ Gamma-Globulin fluoresziert	+
Gamma - Globulin	+ Leukozyten	ø
Antihuman-globulin[++)]	+ Leukozyten	ø

[+)] Leukozyten gewonnen: a. mit Titriplex - Macrodex
b. aus Zitratblut

[++)] Coombsserum Behringwerke

N r . 1

Leukozyten sowie Antiseren.

Kontrolltier

Mensch	Kaninchen nicht sensibilisiert	Agglutination
Leukozyten	+ Serum	ø
Leukozyten	+ Gamma-Globulin	ø
Leukozyten	+ Gamma-Globulin fluoresziert	ø
Gamma - Globulin	+ Leukozyten	ø
Antihuman-globulin	+ Leukozyten	ø

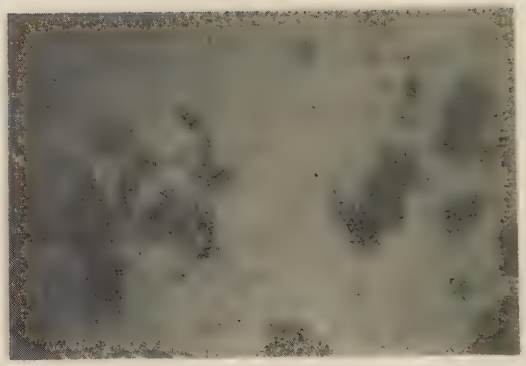

Abb. 1 Agglutination menschlicher Leukozyten durch Antileukozytenserum vom Kaninchen

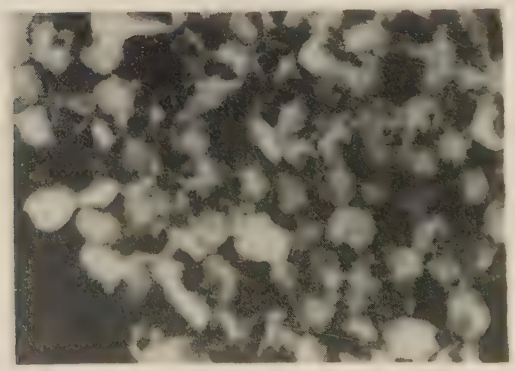

Abb. 2 Plasmafluoreszenz menschlicher Leukozyten durch fluoresziertes Antileukozytengammaglobulin

Abb. 3 Plasmafluoreszenz der Leukozyten des sensibilisierten Kaninchens nach Inkubation mit fluoresziertem Antikaninchenglobulin

Abb. 4 Fluoreszenz tierischer Leukozyten nach Behandlung mit fluoresziertem Antihumanglobulin

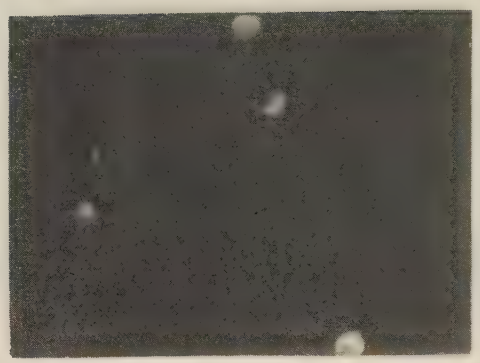

Abb. 5 Deutliche Plasmafluoreszenz der Leukozyten des sensibilisierten Kaninchens trotz Vorbehandlung mit nicht fluoresziertem Antikaninchenglobulin und anschließender Inkubation mit fluoresziertem Antikaninchenglobulin

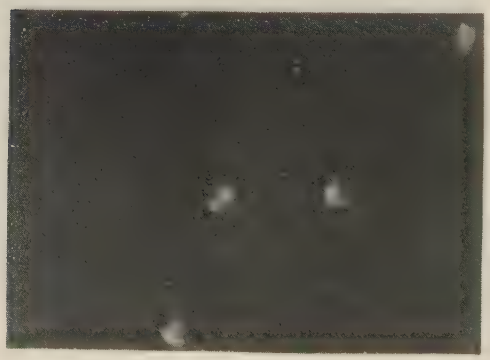

Abb. 6 Brillante Plasmafluoreszenz der Leukozyten des sensibilisierten Kaninchens nach dem Neutralisationsversuch mit Antihumanglobulin und folgender Inkubation mit fluoresziertem Antihumanglobulin

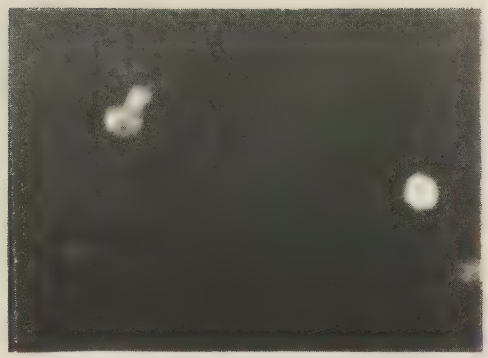

Abb. 7 Diffuse Fluoreszenz vereinzelter Leukozyten eines Kontrolltieres nach Inkubation mit fluoresziertem Anti-Kaninchenglobulin. Schattenhaft sind nicht fluoreszierende Zellen zu erkennen.

Abb. 8 Deutliche Fluoreszenz von Leukozyten des Kontrolltieres nach Bearbeitung mit fluoresziertem Antihumanglobulin

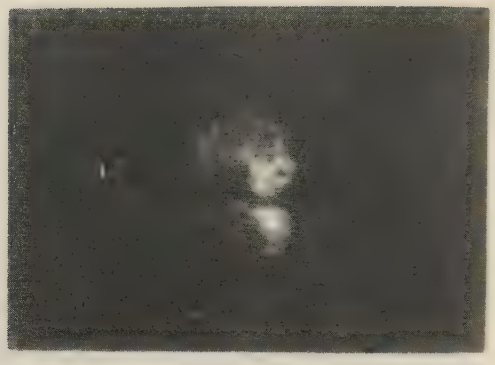

Abb. 9 Fluoreszierendes Plasma einer Knochenmarkzelle nach Inkubation mit fluoresziertem Anti-Kaninchenglobulin (sensibilisiertes Kaninchen)

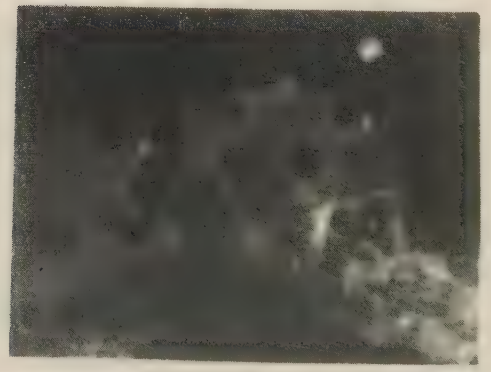

Abb. 10 Fehlende Fluoreszenz der Knochenmarkszellen nach Behandlung mit fluoresziertem Anti-Kaninchenglobulin beim Kontrolltier

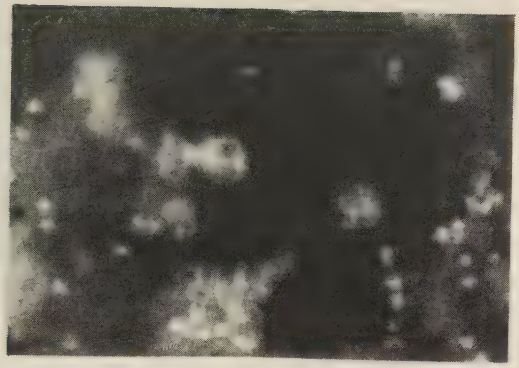

Abb. 11 Plasmafluoreszenz der Exsudatzellen nach Bearbeitung mit fluoresziertem Antikaninchenglobulin (sensibilisiertes Tier)

Abb. 12 Eigenfluoreszenz der Zellen im unfixierten Präparat der Exsudatzellen (sensibilisiertes Kaninchen)

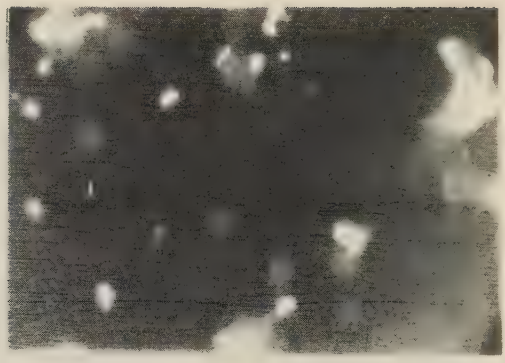

Abb. 13 Abnahme der Eigenfluoreszenz im fixierten Präparat der Exsudatzellen (sensibilisiertes Kaninchen)

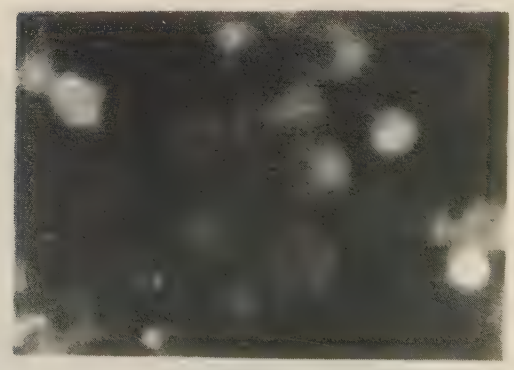

Abb. 14 Der Eigenfluoreszenz entsprechendes Bild der Exsudatzellen nach Inkubation mit fluoresziertem Antikaninchenglobulin bei dem Kontrolltier

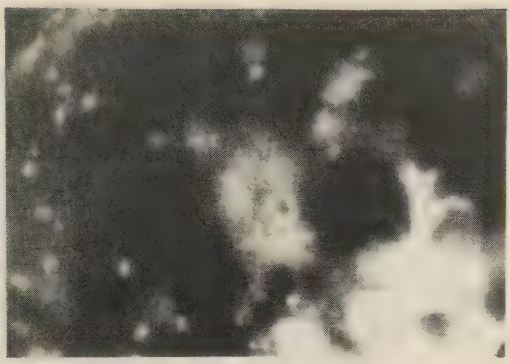

Abb. 15 Exsudatzellen des Kontrolltieres fluoreszieren diffus nach Inkubation mit fluoresziertem Anti-humanglobulin

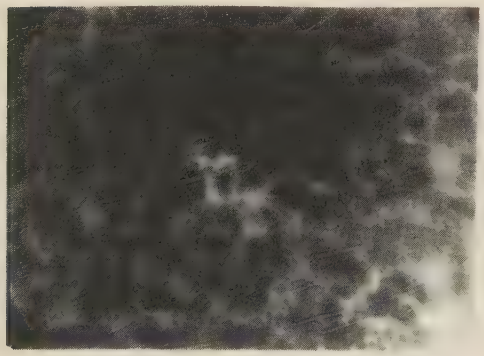

Abb. 16 Fluoreszierender Ring um eine Milzzelle nach Behandlung mit Antikaninchenglobulin (sensibilisiertes Kaninchen). Die Fluoreszenz im Zellinnern ist nicht darstellbar.

Abb. 17 Schattenhaft erkennbar sind Leberzellen auf homogen fluoreszierendem Untergrund nach Behandlung mit Antikaninchenglobulin und folgender Inkubation mit fluoreszierendem Antikaninchenglobulin (sensibilisiertes Kaninchen)

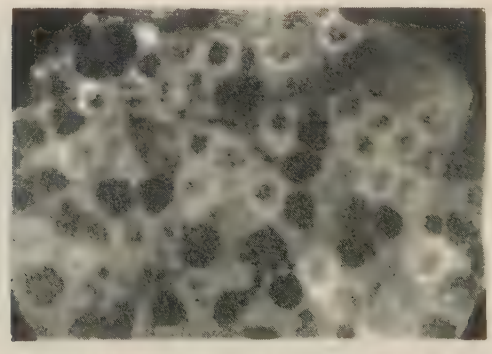

Abb. 18 Randfluoreszenz lymphoider Zellen im Mesenteriallymphknotenausstrich vom sensibilisierten Kaninchen, behandelt mit fluoresziertem Antikaninchenglobulin

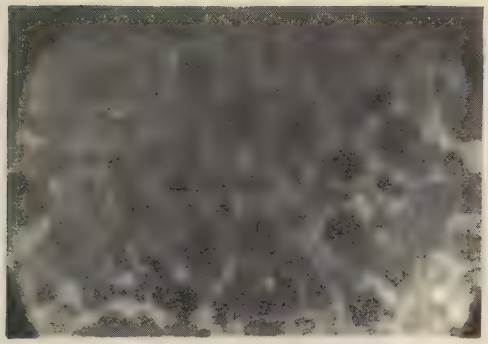

Abb. 19 Fehlen der Fluoreszenz nach Inkubation mit fluoresziertem Anti-Kaninchen-globulin im Mesenterial-lymphknotenausstrich vom Kontrolltier

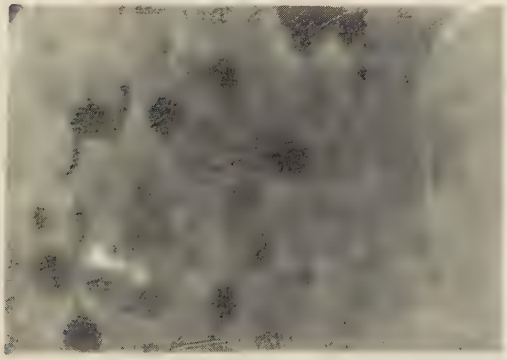

Abb. 20 Eigenfluoreszenz eines unfixierten Markausstriches

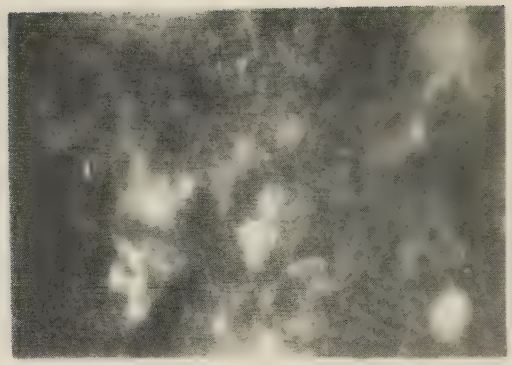

Abb. 21 Deutlichere Fluoreszenz des Bindegewebes eines Markausstriches nach Inkubation mit Fluoreszenzfarbstofflösung

Literaturverzeichnis

1. BIEDL, A., KRAUS, R. — Experimentelle Studien über Anaphylaxie. Wien. klin. Wschr. 363 (1909).

2. BRAUNSTEINER, H., RIGLER, R., PAKESCH, F. — Immunfluorescenz - Untersuchungen an Knochenmarksausstrichen bei primär chronischer Polyarthritis. Klin. Wschr. Jahrg. 40, Heft 22, S. 1139 ff. (1962).

3. BOCK, H.E., — Über die nosologische Stellung der Agranulocytose, insbesondere der Amidopyrin-agranulocytose. Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 47, 213 (München 1935).

4. CALABRESI, P., EDWARDS, E. A., SCHILLING, R. F. — Fluorescent Antiglobulin studies in Leukopenic and Related Disorders. J. Clin. Invest. 38, S. 2091 (1959).

5. DAUSSET, J. — Agranulocytoses et leucopeńies immunologiques. Aspects sérologiques et sérologie des leucocytes en général. Sang. 25, 683 (1954).

6. COONS, A.H., CREECH, H.J., JONES, R.N. — Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 47, 200-202 (1941).

7. COONS, A.H., KAPLAN, M.H. — Lokalization of Antigen in Tissue Cells. II. Improvements in a Method for the Detection of Antigen by Means of Fluorescent Antibody. J. Exp. Med. 91, 1 (1950).

8. COONS, A.H., LEDUC, E.H., CONNOLLY, J.M. — Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. J. Exp. Med. 102, 49 (1955).

9. FRENGER, W., SCHEIFFARTH, F., GIRZ, A. — Untersuchungen über ein zellgebundenes Antigammaglobulin (Rheumatoid-Faktor?) bei chronischer Polyarthritis und anderen Krankheiten. Vortrag Europ. Kongr. Rheumat. Stockholm 1963.

10. HESS, E., ZIFF, M. — Reaction of leucocytes with fluorescent aggregated gamma-globulin. Ann. Meet. Amer. Rheum. Ass. Florida 1960.

11. JANKOVIĆ, B.D., ARSENIJEVIC, K. — The Demonstration of Anti-Leukocyte Antibodies in Human and Rabbit Immune Serum by means of Fluorescent Antibody Technique. Acta. haemat. 21, 387-393 (1959).

12. JANKOVIĆ, B.D. — Specific Staining of Red Cell Antigens by the Use of Fluorescein-Labelled Antibody. Acta haemat. 22, 278-285 (1959).

13. KOPP, W.L. — Demonstration of serum proteins on washed leukocytes by means of fluorescent antibodies. J. Lab. Clin. Med. 62, 18-23 (1963).

14. LUIS, C.J. — The Significance of the Cell Type in the Fluorescein-Globulin Staining of Tissues. British J. Cancer 12, 537 (1958).

15. MARMONT, A., CHIAPPINO, G., DAMASIO, E., D'AMORE, E. — Démonstration par microscopie en immunofluorescence des éléments cellulaires macroglobulinopoiétiques dans la maladie de Waldenström. Schweiz. med. Wschr. 93, 41 (1963) 1445-1448.

16. MAYERSBACH, H. — Technik und Probleme der Immunhistologie. Biologické Práce VII / S. (Verhandlungen des III. internationalen Histologen-Symposions in Smolenice-Bratislava, 22.-25. September 1960.)

17. MAYERSBACH, H. — Methoden und Probleme in der Immunhistologi Ref. IX. Kongr. Dtsch. Ges. Allergieforsch. Bad Lippspringe 1963.

18. MC KENNA, J.L., PISCIOTTA, A.V. — Fluorescence of Megakaryocytes in Idiopathic Thrombocytopenic Purpura (ITP) Stained with Fluorescent Antiglobulin Serum. Blood, Vol. 19, No. 6, 664 (1962).

19. MELLORS, R.C., HEIMER, R., CORCOS, J., KORNGOLD, L. — Cellular origin of rheumatoid factor. J. Exp. Med. 110, 875 (1959).

20. MELLORS, R.C., NOWOSLAWSKI, A., KORNGOLD, L., SENGSON, B.L. — Rheumatoid Factor and the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. J. Exp. Med. Vol. 113, No. 2, pp. 475-484 (1961).

21. MIESCHER, P., VORLAENDER, K.O. — Immunopathologie in Klinik und Forschung. (Stuttgart 1957).

22. MOESCHLIN, S. WAGNER, K. — Leukozytenagglutinine als Ursache von Agranulocytosen (Pyramidon usw.). Schweiz. med. Wschr. 1104 (1952).

23. CYSTESE, B. — Zur Kritik des fluoreszenz-immunologischen Methoden in der Histologie. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 46. Tagung, Dortmund 12.-16. Juni 1962. Sonderdruck Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1962.

24. ORTEGA, L.G., MELLORS, R.C. — Cellular sites of formation of gamma-globulin. J. Exp. Med. 106, 627 (1957).

25. PETRIDES, P., SCHMENGLER, F.E. — Über die Bedeutung der allergischen Schädigung für Klinik und Pathologie hämatologischer Erkrankungen. I. Experimente zur lokalisierten Knochenmarksallergie. Z. Exper. Med. 117, 297 (1951).

26. PIRQUET, C.v., SCHICK, B. — Die Serumkrankheit. (Leipzig und Wien 1905).

27. POETSCHKE, G., UEHLEKE, H., KILLISCH, L. — Untersuchungen mit fluorescein-markierten Antikörpern. I.Allgemeines und Methodisches Z. Immunitätsf. u. exp. Therapie, 114, 393, (1957).

28. POETSCHKE, G., KILLISCH, L., UEHLEKE, H. — Untersuchungen mit fluorescein-markierten Antikörpern. II. Das serologische Verhalten der L-Phase von Proteus. Z. Immunitätsf. u. exp. Therapie 114, 406 (1957).

29. PRESSMAN, D., YAGI, Y., HIRAMOTO, R. — A Comparison of Fluorescein and I 131 as Labels for Determining the in vivo Localization of Anti-Tissue Antibodies. Internat. Archives of Allergy and appl. Immunology. (Int. Arch. Allergy), 12, 125-136, (1958).

30. RIDLEY, A. — Localization of gamma-globulin in experimental encephalomyelitis by the fluorescent antibody technique. Z. Immun.-Forsch. 125 (3, 1963) 173-190.

31. SCHEIFFARTH, F., FRENGER, W. — Immunhaematologie. Dr. Dietrich Steinkopf Verlag Darmstadt (1961).

32. SCHILLING, V. — Das Knochenmark als Organ. III. Funktion des Markparenchyms und Leukozytose. Dtsch. med. Wschr. 467 (1925).

33. SCHILLING, V. — Das Knochenmark als Organ. IV. Funktion des Markparenchyms und Leukozytose. Dtsch. med. Wschr. 516 (1925)

34. SCHMID, F., HAGGE, W. — Beeinflussung unspezifischer Zellreaktionen durch die Tuberkulose-Allergie. Beiträge zur Klinik der Tuberkulose, Bd. 109, S. 139-142 (1953).

35. SMITH, C.W., METZGER, J.F., HOGGAN, M.D. — Immunofluorescence as Applied to Pathologie. The American Journal of Clinical Pathology. Vol. 38, No.1, pp 26-42 (July 1962).

36. STEINBERG, B., MARTIN, R.A. — Factors influencing leukoagglutination by antileukocytic sera. J. Immunol. 51, 421 (1945).

37. UEHLEKE, H. — Markierung von Proteinen mit fluoreszierenden Farbstoffen. Die Naturwissenschaften, 45, 87 (1958).

38. WILMANNS, W. — Indikation zur Behandlung akuter Leukämien mit 6- Mercaptopurin auf biochemischer Grundlage. Dtsch. Med. Wschr. Nr. 17 S. 869-936, Jg. 88 (1963).

39. WOLLENSAK, J., SEYBOLD, G. — Untersuchungen über die Bildungsstätten von Myelom-Proteinen bzw. Gamma-Globulinen. Z. Naturforschung 11 b, 588-592 (1956).

40. WOLLENSAK, J., SEYBOLD, G. — Serum-Protein-Nachweis durch fluoreszierende Antikörper in Leber und Niere. Z. Naturforschg. 12 b, 147-150 (1957).

Herrn Professor Dr. Norbert H E N N I N G möchte ich für das freundlicher Weise übernommene Referat danken.

Ganz besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. med. Werner F R E N G E R für die Überlassung des Themas und sein stets hilfsbereites Interesse, das er dem Entstehen der Arbeit entgegen brachte.

Lebenslauf.

Am 3. August 1934 wurde ich, Sohn des Zahnarztes Dr. Kurt K a h r e und seiner Ehefrau der Zahnärztin Elfriede Kahre, geb. Haupt, als erstes ihrer drei Kinder geboren. Meine Kindheit verlebte ich in Berlin, besuchte dort - seit 1940 - die Volksschule und anschließend - seit 1945 - das Kant-Gymnasium zu Spandau, an dem ich am 2. Februar 1955 die Reifeprüfung bestand.

Das Studium der Medizin und Zahnmedizin begann ich im Sommersemester 1955 an der "Freien Universität" Berlin, setzte es in Heidelberg und Erlangen fort, wo ich nach dem Sommersemester 1958 beide Physika bestand.

Im gleichen Jahr heiratete ich Fräulein Evelyn Schulze-Schurig. Am 31. Juli 1959 wurde mein Sohn Andreas Kahre geboren.

Mit Ausnahme des Sommersemesters 1960, in dem ich an der FU Berlin studierte, betrieb ich das klinische Studium in Erlangen, wo ich am 21. März 1962 mein medizinisches, am 30. Mai 1962 mein zahnmedizinisches Staatsexamen bestand und die Approbation als Zahnarzt erhielt. Vom 15. Juli 1962 bis zum 15. Februar 1963 arbeitete ich als Medizinalassistent am Pathologisch - Anatomischen Institut, vom 16. Februar bis zum 31. Dezember 1963 an der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen - Nürnberg. Am 10. Mai 1963 promovierte ich unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. Herbert Otto zum Dr. med. an der Medizinischen Fakultät der Universität Erlangen - Nürnberg.

Seit dem 1. Januar 1964 bin ich als Medizinalassistent an der Chirurgischen- und Frauenabteilung des Kreiskrankenhauses Kronach tätig.

Fotodruck

– Wiltrud Hogl, Erlangen, Brüxer Straße 9, Telefon 16 36 –